Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Walter Krauland

EIN CHEMISCH-TOXIKOLOGISCHES VERFAHREN ZUM NACHWEIS BASISCHER ARZNEISTOFFE IN KLEINEN BLUTPROBEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Marianne Heymons
aus Berlin

1968

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552705_0045

Aus dem Institut für gerichtliche und soziale Medizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Walter K r a u l a n d

Ein chemisch-toxikologisches Verfahren zum Nachweis basischer Arzneistoffe in kleinen Blutproben

Inaurugal - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Marianne Heymons
aus Berlin

Dekan: Professor Dr. med. Hans Wolfgang S p i e r

Referent: Professor Dr.-Ing. Ernst V i d i c

Korreferent: Professor Dr. med. Helmut C o p e r

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. 9. 1968

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	ALLGEMEINER TEIL	1
	1. Einleitung und Problemstellung Die Bedeutung des Nachweises von Arzneistoffen in Blutproben von Verkehrsteilnehmern nach Verkehrsdelikten und bei Verdacht auf Arzneimittelintoxikation	1
	2. Auswahl der nachzuweisenden basischen Arzneistoffe	3
	3. Arbeitsmethoden zur Isolierung und zum Nachweis basischer Wirkstoffe aus Blutproben	6
	4. Bedeutung und Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Toxikologie	9
B.	EXPERIMENTELLER TEIL Ausarbeitung eines Untersuchungsganges zur Extraktion und nachfolgender dünnschichtchromatographischer Auftrennung basischer Arzneistoffe aus kleinen Blutproben	14 14
	1. Versuche zur Entfernung störender Verunreinigungen aus dem Blut	14
	2. Reinigung des Aceton-Rohextraktes	20
	3. Versuche zur Ausschüttelung der basischen Arzneistoffe mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln im alkalischen Bereich	22
	4. Auswahl geeigneter Fließmittelsysteme zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der untersuchten basischen Wirkstoffe und ihre Detektion auf den Dünnschichtchromatogrammen	25
	5. Arbeitsvorschrift für das neue Verfahren zum Nachweis basischer Arzneistoffe in kleinen Blutproben	33
	6. Auswertung der Modellversuche	38

Seite

C. DIE ANWENDUNG DES VERFAHRENS BEI ZWEI GERICHTS-MEDIZINISCH-TOXIKOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN 41

D. ZUSAMMENFASSUNG 44

E. LITERATURVERZEICHNIS 47

VERZEICHNIS DER TABELLEN

Seite

Tab. 1 Synthetische Analgetica 4
Tab. 2 Analgetica der Morphinreihe 4
Tab. 3 Antihistaminica 5
Tab. 4 Psychopharmaca 5
Tab. 5 Antipyretica 6
Tab. 6 Auftrennung basischer Arzneistoffe in zwei dünnschichtchromatographischen Systemen 28
Tab. 7 Testgemische für die verwendeten dünnschichtchromatographischen Systeme 29
Tab. 8 Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion der Phenothiazinderivate und ihrer Abbauprodukte 30
Tab. 9 Arzneistoffausbeuten nach Anwendung des neuen chemisch-toxikologischen Verfahrens (Modellversuche) 39

A. ALLGEMEINER TEIL

1. Einleitung und Problemstellung

Die Bedeutung des Nachweises von Arzneistoffen in Blutproben von Verkehrsteilnehmern nach Verkehrsdelikten und bei Verdacht auf Arzneimittelintoxikation

In Zusammenhang mit dem ständig steigenden Verbrauch an Medikamenten wird in den letzten Jahren zunehmend eine Einschränkung der Verkehrstauglichkeit durch die kombinierte Wirkung von Arzneistoffen und Alkohol festgestellt.
Nach Untersuchungen von H.-J. WAGNER (8) wurde von 11 % unter Alkohol stehender Verkehrsteilnehmer Medikamenteneinnahme vor dem Verkehrsdelikt zugegeben. Nach PRIBILLA (9), WAGNER (8), KREUSCHER und FREY (16) handelt es sich dabei vorwiegend um Analgetica, Hypnotica, Psychopharmaca und Opiate. Abhängig von Dosierung und Verträglichkeit ist aber damit zu rechnen, daß auch die Einnahme anderer Medikamente allein oder zusammen mit Alkohol zur Verkehrsunsicherheit führen kann.
Die durch Pharmaca bedingte Gefährdung der Verkehrssicherheit wird nach SCHÜLE (10) besonders durch gesteigerte Ermüdbarkeit, mangelnde Konzentration und herabgesetzte Reaktionsgeschwindigkeit der Verkehrsteilnehmer hervorgerufen. Neben diesen psycho-physischen Leistungsstörungen sind auch medikamentös auslösbare Gleichgewichts- und Bewußtseinsstörungen von Bedeutung.
Der medizinische Sachverständige ist zur Beurteilung der Verkehrstüchtigkeit und damit strafrechtlichen Verantwortlichkeit bei Verkehrsdelikten, gemäß § 51 Absatz 1 oder 2 und § 315c des StGB, auf chemisch-toxikologische Untersuchungen von Harn- und Blutproben angewiesen, welche eine Arzneimitteleinnahme mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit beweisen oder ausschließen können.
Der quantitative Nachweis von Arzneistoffen in einer Blutprobe des Beschuldigten kann aus mehreren Gründen entscheidend sein.

1. Aus dem Ergebnis der chemischen Harnanalyse allein kann nicht ohne weiteres auf Medikamenteinwirkung zur Tatzeit geschlossen werden (OSTERHAUS (11,12), SOEHRING (13), VIDIC (14)). Das zeitliche Wirkungsmaximum der nur in einer Harnprobe nachgewiesenen Medikamente ist nicht sicher abgrenzbar, auch wenn ihr Metabolismus bekannt ist.
2. Nach § 81a der StPO kann ohne Einwilligung des Beschuldigten nur die Entnahme einer Blutprobe erzwungen werden. Der Sistierte kann sich weigern eine Harnprobe für die chemisch-toxikologische Untersuchung zur Verfügung zu stellen, und bei tätlichem Widerstand kann eine zwangsweise Katheterisierung nicht unbedenklich vorgenommen werden. Nach § 81a der StPO sind andere körperliche Eingriffe, die vom Arzt zu Untersuchungszwecken vorgenommen werden können, nur dann zulässig, wenn der Beschuldigte dadurch keinen gesundheitlichen Nachteil haben kann.
3. Wegen Verkehrsdelikten strafrechtlich belangte Personen bringen oft erst vor Gericht die Einnahme von Medikamenten zur Schuldentlastung vor. Mit dieser Schutzbehauptung soll dann versucht werden ein Fehlverhalten zu erklären, dessen Voraussehbarkeit abgestritten wird. Außerdem kann der Beschuldigte während der Gerichtsverhandlung seine Aussage über Einnahme und Dosierung der Medikamente ändern.
Es war Aufgabe der vorliegenden Arbeit, aus kleinen Blutproben, wie sie nach Bestimmung des Blutalkohols in den Venülen verbleiben, ein chemisch-analytisches Verfahren zum halbquantitativen Nachweis basischer Arzneistoffe zu erarbeiten.

Bei Überprüfung der Frage, ob Arzneimittel allein oder als wesentlich wirkende Ursache zum Tode geführt haben, ist das Ergebnis der chemischen Blutanalyse zusammen mit der toxikologischen Untersuchung anderer Leichenteile zur Erstellung forensisch-toxikologischer Gutachten von Bedeutung.
1. Die Konzentration der im Blut nachgewiesenen Medikamente steht in unmittelbarer Beziehung zur toxikologischen Wirkung auf den Organismus.
2. Für die meisten Arzneistoffe kann erfahrungsgemäß angenommen werden, daß der freien, unveränderten Form der Medikamente,

wie sie hauptsächlich im Blut nachgewiesen werden kann, die pharmakologische Hauptwirkung zukommt.
Zur Ermittlung der Todesursache bei gerichtlichen Sektionen wird die toxikologische Untersuchung hauptsächlich bei Verdacht auf Arzneimittelintoxikation vorgenommen; und wenn bei der Leichenöffnung keine Organveränderungen nachweisbar sind, die einen Tod aus natürlicher Ursache erklären könnten, und die Leiche außerdem keine Veränderungen aufweist, die auf fremde, mechanische Gewalteinwirkung schließen lassen.

2. Auswahl der nachzuweisenden basischen Arzneistoffe

Nach BÖHMER (15) wurde in den letzten Jahren ein zunehmender Verbrauch an zur Sucht führenden Medikamenten festgestellt. Bei der Auswahl der basischen Arzneistoffe wurde deswegen besonderer Wert auf den chemisch-toxikologischen Nachweis halb- und vollsynthetischer Opiumalkaloide gelegt. Außerdem wurden basische Wirkstoffe in den Untersuchungsgang aufgenommen, die besonders oft in der ärztlichen Praxis und im Krankenhaus verordnet werden, wie Psychopharmaca, Antihistaminica und Antipyretica. Von diesen Arzneimittelgruppen ist auch bekannt, daß sie allein oder gleichzeitig mit Alkohol eingenommen, oft als Teil- oder Hauptursache bei Verkehrsdelikten nachgewiesen werden können. Bei Verordnung dieser Medikamente sollte deswegen der Arzt dem Patienten raten, nach einer Empfehlung der Bundesärztekammer von 1964, kein Kraftfahrzeug während der Therapie zu führen.
Es wurden die in den Tabellen 1 - 5 verzeichneten basischen Arzneistoffe untersucht.

Tabelle 1

Synthetische Analgetica

Handelsname	internationales Synonym	chem. Bezeichnung
Dolantin	Pethidin	1-Methyl-4-phenyl-piperidin-4-carbonsäureäthylester
Jetrium	Dextromoramid	2,2-Diphenyl-3-methyl-4-morpholino-butyrylpyrrolidin
Polamidon	Methadon	6-Dimethylamino-4,4-diphenylheptanon
Ticarda	Normethadon	6-Dimethylamino-4,4-diphenyl-3-hexanon

Tabelle 2

Analgetica der Morphinreihe

Handelsname	internationales Synonym	chem. Bezeichnung
Codein		Methylmorphin
Dicodid	Hydrocodon	Dihydrocodeinon
Dilaudid	Hydromorphon	Dihydromorphinon
Dionin		Äthylmorphin
Dromoran	Racemorphan	3-Hydroxy-N-methylmorphinan
Eukodal	Oxycodon	Dihydrohydroxycodeinon
Narcotin		
Paracodin		Dihydrocodein

Tabelle 3
Antihistaminica

Handelsname	internationales Synonym	chem. Bezeichnung
Avil	Prophenpyridamin	N,N-Dimethyl-3-phenyl-3-(2-pyridyl)-propylamin
Kolton	Piperinhydrinate	N-Methylpiperidyl-4-benzhydryl-aether-8-chlor-theophyllinat
Sandosten	Thenalidine	1-Methyl-4-(N-phenyl-N'-thenyl-(2')-amino)-piperidin
Soventol		N-Phenyl-N-benzyl-4-amino-1-methylpiperidin

Tabelle 4
Psychopharmaca

Handelsname	internationales Synonym	chem. Bezeichnung
Megaphen	Chlorpromazin	10-(3'-Dimethylaminopropyl)-3-chlor-phenothiazin
Melleril	Thioridazin	10-(1'-Methyl-piperidyl-(2')-äthyl)-3-methylmercapto-phenothiazin
Neurocil	Levopromazin	10-(2'-Methyl-3-dimethylaminopropyl)-3-methoxy-phenothiazin
Taxilan	Perazin	10-(3'-(1''-Methyl-4''-piperazinyl)-propyl)-phenothiazin
Tofranil	Imipramin	N-(3'-Dimethylaminopropyl)-iminodibenzyl
Valium	Diazepam	7-Chlor-1,3-dihydro-1-methyl-5-phenyl-2H-1,4-benzodiazepin-2-on

Tabelle 5
Antipyretica

Handelsname	internationales Synonym	chem. Bezeichnung
Antipyrin	Phenazon	1-Phenyl-2,3-dimethyl-5-pyrazolon
Pyramidon	Aminophenazon	1-Phenyl-2,3-dimethyl-4-dimethylamino-5-pyrazolon
Chinin		

3. Arbeitsmethoden zur Isolierung und zum Nachweis basischer Wirkstoffe aus Blutproben

Vor dem eigentlichen qualitativen und quantitativen Nachweis von Arzneistoffen in Körperflüssigkeiten und Organen sind zunächst immer Extraktions- und Reinigungsverfahren zur Abtrennung der reinen Substanzen aus dem biologischen Material notwendig. Die Nachweisverfahren sollen hochspezifisch sein, eine große Informationskapazität besitzen, sowie nur eine geringe Störanfälligkeit aufweisen und möglichst wenig Arbeitsaufwand erfordern (G.SCHMIDT (17)).
Die Standardmethode nach STAS (18) und OTTO (19) zur Isolierung basischer Arzneistoffe wird heute vielfach nur noch modifiziert angewendet, da das ursprüngliche Verfahren den heutigen Ansprüchen oft nicht genügt. Nach FREIMUTH (20) sind die durch das klassische Verfahren gewonnenen Extrakte noch zu verunreinigt und deswegen nicht immer zum quantitativen Nachweis der Wirkstoffe geeignet.
Zur Isolierung basischer Arzneistoffe aus dem Blut werden oft spezielle Extraktionsverfahren, wie z.B. kontinuierliche Extraktion und Extraktion durch Ausschüttelung mit Lösungen, und außerdem Fällungsverfahren angewendet.
Die Extraktionsverfahren lassen sich auf Grund ihrer verschie-

denen Arbeitsmethoden in folgende Gruppen aufteilen:
1. Extraktion der Arzneistoffe aus der Blutprobe mit organischen Lösungsmitteln nach Vorreinigung.
Zur Vermeidung von lipoid- und proteinhaltigen Extrakten und damit zur Vermeidung von Emulsionen wird von CURRY und PHANG (21) vorgeschlagen, die Blutprobe zunächst mit 95 %igem Alkohol zu extrahieren. Nach Filtration des Alkohlextraktes werden die präzipitierten Proteine abfiltriert.
Zur Ausfällung der Proteine, die als unerwünschte Begleitstoffe den Arzneimittelnachweis empfindlich stören können, wird von STREET (22) und von KOPPANY et al. (23) die Methode nach FOLIN-WU (24) vorgeschlagen. Andere Autoren verwenden als Eiweißfällungsmittel Trichloressigsäure, Perchlorsäure, Pikrinsäure, Wolframmolybdänsäure, Zink- und Cadmiumhydroxid.
Von CHERAMY und LOBO (25), ALHA und LINDFORS (26) wird die Extraktion mit 70 %igem Aceton empfohlen.
PAULUS (27) und MACHATA (28) schlagen die präparative Dünnschichtchromatographie zur Reinigung der Extrakte aus biologischem Material vor.
Auch säulenchromatographische Verfahren werden zur Vorreinigung von Blutextrakten angewendet. STOLMAN und STEWART (29) beschreiben ein Verfahren mit Florisil-Säulen, das von STOKES et al. (30) weiterentwickelt wurde.
Das Verreiben der Blutprobe mit einem Trägerstoff wird von VIDIC (31) und anderen Autoren vorgeschlagen. Nach VIDIC eignen sich als Trägerstoffe, beziehungsweise Mittel zur Entwässerung, Gemische von Kieselgur und Kieselgel, sowie Seesand und Natriumsulfat. Von KOPPANY et al. (23) wurde Calciumsulfat verwendet, LEVVY (32) nahm Ammoniumsulfat und RAVENTOS (33) Natriumphosphat.

2. Bei vielen Extraktionsverfahren werden die basischen Arzneistoffe aus dem Vollblut, das manchmal verdünnt wird, oder aus dem Plasma direkt mit organischen Lösungsmitteln extrahiert.
Im alkalischen Bereich wird nach der Arbeitsmethode von SUNSHINE und GERBER (34) mit Chloroform extrahiert, BÄUMLER

und RIPPSTEIN (35) nehmen für die Ausschüttelung Äther. Von WALDI (36) wird zur Extraktion Äther und Äthylacetat vorgeschlagen. MULÉ (37) verwendet zur Extraktion aus dem Plasma Äthylenchlorid-Isobutanol. COCHIN und DALY (38) bevorzugen Methylenchlorid.
VIDIC und SCHÜTTE (39) beschreiben einen Trennungsgang für basische Arzneistoffe, die je nach ihrer Polarität und Basizität zuerst mit Cyclohexan und danach mit Amylacetat ausgeschüttelt und anschließend mit wässriger Essig- bezw. Salzsäure reextrahiert werden.

3. Verfahren zur kontinuierlichen Extraktion von kleinen Arzneistoffmengen im Blut werden u.a. von FELDSTEIN und KLENDSHOY (40), UMBERGER et al. (41), CURRY und PHANG (21) und von H.J. UHLMANN (42) beschrieben. Die Extraktion erfolgt in unterschiedlich konstruierten Flüssigkeitsperforatoren mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln. Nach GENDI et al. (43) sind die Arzneistoffausbeuten bei der Extraktion im Scheidetrichter und bei kontinuierlichen Extraktionsverfahren jedoch gleich.

4. Von GENDI, KISSER und MACHATA (43) wird ein Verfahren angegeben, bei dem die basischen Substanzen mit Tetraphenylborat gefällt werden. Von HÄUSSLER (44) wurde die Ausschüttelung der Tropäolin-Additionsverbindungen mit organischen Lösungen vorgeschlagen.

Zur Auftrennung und Identifizierung der extrahierten und gereinigten basischen Arzneistoffe werden in den letzten Jahren zunehmend chromatographische Verfahren angewendet, wie Papier- und Dünnschichtchromatographie, Säulen- und Gaschromatographie. Diese Verfahren beruhen auf Adsorptions- und Verteilungsphänomenen zwischen zwei Phasen, der sog. stationären und mobilen Phase.
Neben der papierchromatographischen Auftrennung basischer Wirkstoffe, grundlegende Arbeiten von JATZKEWITZ (45) und VIDIC (46), eignet sich in der Toxikologie besonders die Dünnschichtchromatographie zur Analyse eines Substanzgemisches. Die Schnelligkeit und Empfindlichkeit dieser Methode macht sie

vielen anderen Verfahren überlegen.
Als physikalische Methoden werden oft die Ultraviolettspektrophotometrie und Messung der Infrarotabsorption zur Identifizierung der Wirkstoffe herangezogen. Wenn genügend Substanz zur Verfügung steht, können nach Isolierung der Arzneistoffe auch die Mikrosublimation und Schmelzpunktbestimmung vorgenommen werden.

4. Bedeutung und Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Toxikologie

Von IZMAILOW und SHRAIBER (47) wurde 1938 erstmals das Prinzip der Dünnschichtchromatographie beschrieben. Den russischen Forschern gelang damals eine Trennung verschiedener Substanzen auf losen Aluminiumoxid-Schichten, die sie auf Glasplatten auftrugen. Zur Weiterentwicklung der Adsorptionschromatographie auf Glasplatten haben u.a. MEINHARD und HALL (48), sowie KIRCHNER, MILLER und KELLER (49) beigetragen. Von STAHL (1) wurden die bisherigen dünnschichtchromatographischen Verfahren standardisiert und die allgemeine Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Analyse organischer Substanzen ermöglicht.
Bei der Dünnschichtchromatographie wird eine Lösung des zu trennenden Substanzgemisches zusammen mit entsprechenden Testsubstanzen in verschiedener Konzentration auf eine Glasplatte aufgetragen, die mit einem organischen (z.B. Polyamide) oder anorganischen Sorptionsmittel, wie Kieselgel oder Aluminiumoxid, beschichtet ist. In einer geschlossenen Entwicklungskammer erfolgt dann durch das Fließmittel, meistens ein Lösungsmittelgemisch, die Auftrennung des Substanzgemisches in die einzelnen Bestandteile, abhängig von der Adsorptionskraft der stationären Phase, Polarität der zu trennenden Wirkstoffe und Elutionswirkung der mobilen Phase.

Von MACHATA (50) wurde 1960 erstmals die Anwendung der Dünnschichtchromatographie bei der toxikologischen Analyse basischer Arzneistoffe beschrieben. Seitdem haben die dünnschichtchromatographischen Verfahren in der forensischen Toxikologie

immer mehr an Bedeutung gewonnen, da sie einige entscheidende Vorteile gegenüber der Papierchromatographie aufweisen. Infolge der höheren Empfindlichkeit der Dünnschichtchromatographie sind allgemein noch Wirkstoffmengen von 2 - 5 µg nachweisbar, in besonderen Fällen lassen sich auch noch Bruchteile eines µg feststellen. Dies ist besonders im Hinblick auf den forensischen Nachweis basischer Arzneistoffe von Wichtigkeit, da die basischen Arzneimittel oft nur geringe Mengen an Wirkstoffen enthalten. Wichtig ist neben der Zeitersparnis bei der Entwicklung, die nur 30 - 60 Minuten beansprucht, gegenüber 12 - 24 Stunden bei der Papierchromatographie, die Unempfindlichkeit der Trägerstoffe gegen aggressive Nachweisreagenzien. Sprühreagenzien, die z.B. konzentrierte Schwefelsäure oder konzentrierte Salpetersäure enthalten, können in der Papierchromatographie wegen der leichten Zerstörbarkeit des Papiers nicht angewendet werden.

Stärker als bei der Papierchromatographie können sich dagegen in den Fließmittelsystemen mitentwickelte Verunreinigungen der biologischen Extrakte auf die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Arzneistoffe auswirken. Diese mitextrahierten Begleitstoffe zeigen oft ein ähnliches chromatographisches Verhalten (Rf-Wert) und werden meist auch mit den Sprühreagenzien für basische Substanzen angefärbt. Bei der Ausarbeitung eines Verfahrens zur Extraktion von Arzneistoffen aus dem Blut mit nachfolgender dünnschichtchromatographischer Auftrennung und Sichtbarmachung mit Sprühreagenzien muß daher besonderer Wert auf die Abtrennung von Begleitstoffen gelegt werden, die den Arzneimittelnachweis stören.

Nach KELEMEN und PATAKI (51) ist infolge unterschiedlicher Qualität und Stärke der Trägerschichten die Reproduzierbarkeit der Rf-Werte oft nicht möglich. Dieser Nachteil kann aber durch die Mitentwicklung von Test- oder Leitsubstanzen leicht vermieden werden. Bei Bestimmung des Rf-Wertes der unbekannten Substanz wird dann die Wegstrecke (Startpunkt bis Fleckmittelpunkt) der gesuchten Verbindung auf die der Leitsubstanz bezogen.

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung basischer Substanzen werden von verschiedenen Autoren neutrale Fließmittel verwendet, die aus einem Lösungsmittel oder einem Gemisch von

organischen Lösungsmitteln bestehen, die verschiedene Polarität besitzen. Am häufigsten enthalten die Lösungsmittelgemische Chloroform, Aceton, Cyclohexan, Benzol und Methanol. Andere Autoren setzen dem Laufmittel entweder eine Säure oder eine Base zu. Als Säuren werden oft die Essigsäure und die Ameisensäure verwendet, als Basen werden Amine und Ammoniak bevorzugt.
Die Sorptionsschichten (stationäre Phase) sind meistens anorganische Trägerstoffe wie Kieselgel oder Aluminiumoxid.

Die Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Trennung und Identifizierung basischer Wirkstoffe ist bisher von vielen Autoren beschrieben worden. Die unter Verwendung verschiedener Trägerschichten und Fließmittel entwickelten dünnschichtchromatographischen Systeme wurden jedoch meistens mit basischen Reinsubstanzen erarbeitet. Der Nachweis dieser Stoffe in biologischem Material wurde nur selten erprobt.

Von WALDI, SCHNACKERZ und MUNTER (52) wurde eine systematische Alkaloid-Analyse beschrieben. Die Autoren trennten 54 Alkaloide durch Kombination mehrerer Diäthylamin enthaltender Fließmittel mit zunehmender Polarität. Auf Kieselgel-Schichten erfolgte u.a. die Auftrennung basischer Wirkstoffe mit dem Fließmittel Cyclohexan Diäthylamin (9:1) und auf Aluminiumoxid-Schichten mit Cyclohexan-Chloroform-Eisessig (60:30:10).

Zum Nachweis von Arzneimitteln aus biologischem Material wird von BÄUMLER und RIPPSTEIN (35) die Dünnschichtchromatographie empfohlen. Opiumalkaloide und ihre synthetischen Ersatzmittel, Phenothiazine und andere basische Wirkstoffe werden auf Kieselgel-Schichten mit dem Fließmittelgemisch Methanol-Aceton-Triäthanolamin (50:50:1,5) getrennt.

Von MACHATA (50) wurden basische Wirkstoffe auf Kieselgel-Schichten mit dem Fließmittel Methanol getrennt.

Toxikologisch wichtige basische Arzneistoffe trennten VIDIC und SCHÜTTE (39) auf Kieselgel-Schichten mit einer 0,1n-methanolischen Ammoniaklösung als Fließmittel.

Ein dünnschichtchromatographischer Nachweis von basischen Suchtmitteln wird von UHLMANN (42) beschrieben. Auf Kieselgel-Schichten werden die basischen Arzneistoffe mit dem Laufmittel Isopropanol-Ammoniaklösung 25 % (9:1) aufgetrennt.

Phenothiazine und ähnlich wirkende Arzneistoffe werden von PAULUS, HOCH und KEYMER (53) mit den Fließmitteln Benzol-Aceton-Ammoniaklösung 25 % (50:10:5) und Benzol-Äthanol-Ammoniaklösung 25 % (50:10:5) getrennt. Die Detektion erfolgt durch verschiedene Sprühreagenzien: Kaliumpermanganatlösung, modifiziertes Dragendorff-Reagens, äthanolische Schwefelsäure (10 %), äthanolische Salpetersäure (10 %) und Wasserstoffperoxidlösung (10 %).

EBERHARDT, LERBS und FREUNDT (54) verwenden für den dünnschichtchromatographischen Nachweis von psychotropen Phenothiazinderivaten das Laufmittel Pyridin-Petroläther-Methanol (1:4,5:0,1).

AWE und SCHULZE (55) untersuchten die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Antihistaminen und Phenothiazinen. Die Identifizierung erfolgte durch Kombination der Ergebnisse aus einem basischen und vier neutralen Systemen. Zur Detektion wurde als Sprühreagens Formalin-Schwefelsäure verwendet.

Einen dünnschichtchromatographischen Nachweis von Pyrazolonen haben AWE und TRACHT (56) beschrieben. Mit dem Lösungsmittelgemisch Chloroform-Aceton (7:3) und Äthanol-Chloroform-Aceton (0,3:7:7) erfolgte die Auftrennung der Substanzen auf Kieselgel-Schichten.

Mit einem Fließmittel allein, wie z.B. von BÄUMLER und RIPPSTEIN (35) beschrieben, ist eine sichere Identifizierung von Arzneistoffen für forensisch-toxikologische Zwecke nicht möglich. Infolge der kurzen Laufstrecke, die zur Trennung einer großen Anzahl von Substanzen zur Verfügung steht, können verschiedene Arzneistoffe den gleichen oder ähnlichen Rf-Wert haben. Um jeden Irrtum beim Nachweis zu vermeiden, sollten mehrere Fließmittelsysteme und verschiedene Sorptionsschichten

verwendet werden. Die Sicherheit der Aussage kann dann durch geeignete Kombination der Ergebnisse gewährleistet werden.

B. EXPERIMENTELLER TEIL

Ausarbeitung eines Untersuchungsganges zur Extraktion und nachfolgender dünnschichtchromatographischer Auftrennung basischer Arzneistoffe aus kleinen Blutproben

1. Versuche zur Entfernung störender Verunreinigungen aus dem Blut

Zum Nachweis von Arzneistoffen in den Blutresten, wie sie nach Bestimmung der Blutalkoholkonzentration in den Venülen verbleiben, ist nur ein mikroanalytisches Verfahren brauchbar.
Ein Fällungsverfahren erscheint nicht geeignet, da die zu erwartenden Arzneistoffkonzentrationen im Blut zu gering sind, und außerdem neben den basischen Wirkstoffen auch andere stickstoffhaltige Verbindungen als unerwünschte Begleitstoffe ausgefällt würden. Es handelt sich dabei vorwiegend um Stoffwechselprodukte wie Kreatin, Kreatinin, Harnstoff und Harnsäure.
Bei der kontinuierlichen Extraktion wirkt sich durch die lange Extraktionsdauer der hohe Anteil mitextrahierter Verunreinigungen nachteilig aus.
Da im Rahmen der Problemstellung ein einfaches Verfahren ohne großen Zeitaufwand und teure Apparaturen gefordert wurde, erschien ein Ausschüttelungsverfahren zur Extraktion am besten geeignet. Zum Nachweis der basischen Wirkstoffe wurde die Dünnschichtchromatographie unter den chromatographischen Verfahren bevorzugt, da diese Methode die toxikologische Analyse wesentlich vereinfacht und eine weitgehende Herabsetzung der Nachweisgrenze auf 2 - 5 µg ermöglicht.
Bei der Dünnschichtchromatographie muß allerdings, wie schon im Abschnitt A 4 ausgeführt, die größere Störanfälligkeit durch mitentwickelte Verunreinigungen berücksichtigt werden. Es war daher Hauptaufgabe der vorliegenden Arbeit, ein Ausschüttelungsverfahren zu erarbeiten, das neben einer möglichst vollständigen Extraktion der nachzuweisenden basischen Wirkstoffe alle jene störenden Begleitstoffe weitgehend beseitigt,

welche die dünnschichtchromatographische Auftrennung und Identifizierung stören können.

Die Ausschüttelung von Arzneistoffen aus dem Blut erfolgt mit organischen Lösungsmitteln, die mit Wasser nicht oder nur beschränkt mischbar sind. Die Extraktion erfolgt nach dem Prinzip des Nernst'schen Verteilungssatzes. Danach ist das Verhältnis der Konzentrationen eines sich zwischen zwei nicht mischbaren Phasen verteilenden Stoffes im Gleichgewichtszustand bei gegebener Temperatur konstant. Diese Konstante wird als Verteilungskoeffizient bezeichnet und hat bei gegebenen Phasen für jeden Wirkstoff einen charakteristischen Wert. Bei der quantitativen Extraktion von Arzneistoffen muß deshalb berücksichtigt werden, daß bei ungünstigen Verteilungskoeffizienten öfter ausgeschüttelt werden muß.
Die in der vorliegenden Arbeit genannten, aus dem Blut zu extrahierenden Wirkstoffe gehören zur Gruppe der schwachen Basen mit pK-Werten von 6 - 9. In wässriger Lösung liegen sie als ionisierte und nichtionisierte Verbindungen vor, wobei das Gleichgewicht mehr zu Gunsten des nichtionisierten Anteils verschoben ist. Da die nichtdissoziierten Basen in organischen Lösungsmitteln viel besser löslich sind als die dissoziierten Salze, muß vor dem Ausschütteln durch Zugabe von Protonenakzeptoren (Basen) die Ionisation möglichst weitgehend zurückgedrängt werden.
Analgetica der Morphinreihe, wie z.B. Dilaudid und Dromoran, und einige Alkaloide zeigen amphotere Eigenschaften, da sie als tertiäre Amine nicht nur Basencharakter haben, sondern infolge phenolischer und enolischer Hydroxyl- oder Carboxylgruppen auch als Protonendonatoren wirken. Diese basischen Arzneistoffe liegen bei Überschuß von Protonendonatoren und Protonenakzeptoren in ionisierter Form vor. Bei Zugabe von Protonenakzeptoren werden Phenolate gebildet, infolge Dissoziation des Protons der sauren Gruppe. Eine quantitative Extraktion aus wässriger Lösung mit organischen Lösungsmitteln ist deswegen nur im Bereich des isoelektrischen Punktes möglich.

Nach STRAIN (57) können die organischen Lösungsmittel nach

steigender Polarität und damit Zunahme der eluierenden Wirkung angeordnet werden. Bei den Bestimmungen der von Äther, Aceton, Äthylacetat, Chloroform und Äthanol mitextrahierten Verunreinigungen aus Blutproben wurde festgestellt, daß diese mit steigender Polarität des organischen Lösungsmittels zunahmen. Es waren besonders die Extrakte der wasseraufnehmenden und stark lipophilen Lösungsmittel sehr verunreinigt. Bei Zusatz von Aceton zu Äthylacetat und Alkohol war eine Verminderung der mitextrahierten unerwünschten Begleitstoffe, wie Lipoide, Lipide und Proteine, nachweisbar. Die Blutextraktion mit Aceton allein ergab einen Rohextrakt mit relativ gutem Reinheitsgrad, der außerdem auch wenig gefärbt war.

Bei direkter Ausschüttelung der Blutprobe (Vollblut) mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln kam es immer zur Bildung von Emulsionen und Blutkoagulaten. Da erfahrungsgemäß Arzneistoffe teilweise in die Konglomerate eingeschlossen werden, war dieses Verfahren nicht ohne weiteres zur quantitativen Extraktion der basischen Wirkstoffe geeignet.

Das Verreiben der Blutprobe mit einem Trägerstoff vor der Extraktion mit organischen Lösungsmitteln hat viele Vorteile. Das in der Blutprobe enthaltene Wasser wird gebunden, durch die Verreibung kommt es nicht zur Bildung von Blutkoagulaten, und durch mechanische Verteilung der Arzneistoffe sind bessere Voraussetzungen für die quantitative Extraktion gegeben. Nach STRAIN (57) sind die Trägerstoffe nach steigender Adsorptionskraft geordnet:

Saccharose, Stärke
Inulin
Magnesiumcitrat
Talkum
Natriumcarbonat
Kaliumcarbonat
Calciumcarbonat
Calciumphosphat
Magnesiumcarbonat
Magnesia (Merck)

Aktivierte Kieselsäure
Aktiviertes Magnesiumsilikat
Aktiviertes Aluminiumoxid
Aktivierte Tierkohle
Aktivierte Magnesia

Der Trägerstoff sollte theoretisch folgende Anforderungen erfüllen:

1. Keine Adsorption der basischen Arzneistoffe
2. Selektive Adsorption störender Begleitstoffe aus der Blutprobe
3. Wasseraufnahmevermögen
4. Keine Abgabe von Verunreinigungen an das organische Lösungsmittel

Da mit zunehmender Aktivität der Trägerstoffe eine Adsorption der basischen Arzneistoffe nachweisbar war, wurden Versuche mit Kieselgur und Seesand vorgenommen. Zunächst wurden wässrige Arzneistofflösungen mit den Sorptionsmitteln verrieben und anschließend mit Aceton extrahiert. Als Lösungsmittel wurde wasserfreies Aceton gewählt, wegen der bereits erwähnten vorteilhaften Eigenschaften. Die Ausbeute an zugesetzten Arzneistoffen war bei beiden Trägerstoffen gut.

Bei der Ermittlung der Arzneistoffkonzentration im Acetonextrakt wurde so verfahren, daß die filtrierte Extraktlösung zunächst auf einem Wasserbad bis zur Trockene eingedampft wurde. Nach dem Verfahren von VIDIC (58) wurde dann der Verdampfungsrückstand mit einer auf pH 5,6 eingestellten Phosphatpufferlösung (15 ml) aufgenommen und anschließend Bromkresolgrünlösung zugegeben. Viele basische Substanzen bilden mit Bromkresolgrün molekulare Additionsverbindungen, die bei der Extraktion mit Benzol (50 ml) gelb gefärbt in die organische Phase übergehen. Nach dem Abtrennen der Benzolphase werden die Additionsverbindungen durch Ausschütteln mit $\frac{1}{20}$ normaler Natronlauge aufgespalten, wobei die freie Base des Arzneistoffes in die organische Phase übergeht. Die Salzform des Indikators verursacht eine Blaufärbung der Natronlauge, deren Intensität jeweils der extrahierten Arzneistoffmenge propor-

tional ist. Die quantitative Bestimmung der Wirkstoffkonzentration erfolgte dann photometrisch mit Hilfe von Eichkurven. Neben diesem indirekten quantitativen Nachweis basischer Wirkstoffe ist auch ein dünnschichtchromatographisches Verfahren zur halbquantitativen Bestimmung der Arzneistoffausbeute in dem Aceton-Rohextrakt verwendet worden. Der Verdampfungsrückstand wurde auf eine mit Kieselgel G beschichtete Dünnschichtplatte aufgetragen und mit dem Fließmittel Cyclohexan-Diäthylamin (9:1) nach WALDI et al. (52) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit dem Dragendorff-Reagens in der Modifikation nach JATZKEWITZ. Die Größe und Intensität der Farbflecken wurde mit den Flecken einer Standardreihe bestimmter Stoffmengen verglichen.

Bei Verreibungen von Blut mit Seesand zeigte sich, daß der Aceton-Rohextrakt stärker verunreinigt war als nach Verreiben der Blutprobe mit Kieselgur. Durch das sehr geringe Wasserbindungsvermögen von Seesand wird der Wassergehalt und damit die Polarität des organischen Lösungsmittels erhöht, so daß es nur zu einer geringen Adsorption unerwünschter Begleitstoffe an den Trägerstoff kommen kann. Das schwach aktive Sorptionsmittel Kieselgur, das etwa die Aktivität des Talkums besitzt, ist dagegen wegen der selektiven Adsorption hochmolekularer Verbindungen aus dem Blut als Trägerstoff gut geeignet. Es ist vorstellbar, daß ein großer Teil von Proteinen, Lipiden, Lipoiden und Farbstoffen beim Verreiben in der großporigen Oberfläche der Kieselgur zurückgehalten wird.

Der Zusatz einer Base zu der Verreibung erwies sich zur Erhöhung der Ausbeute an basischen Wirkstoffen als vorteilhaft. Zunächst wurde der Blut-Kieselgur-Verreibung 2 ml einer konzentrierten Ammoniaklösung zugesetzt. Wegen der Löslichkeit des Ammoniaks in Aceton kam es zur Bildung von Ammoniumsalzen im Verdampfungsrückstand der organischen Phase, die sich für die dünnschichtchromatographische Auftrennung der basischen Substanzen nachteilig auswirkten. Auf den Dünnschichtchromatogrammen trat sogar teilweise eine Ablösung der Trägerschichten auf, wegen Überladung der Startpunkte mit Ballaststoffen. Infolge der Flüchtigkeit des Ammoniaks schwankte die Basizität

der wässrigen Phase, wodurch Ausbeuteverluste entstanden, die mit dem indirekten quantitativen Verfahren nachweisbar waren.

Der Zusatz einer Natriumcarbonatlösung (7 %) zu der Verreibung erwies sich dagegen als günstig; Natriumcarbonat ist in Aceton kaum löslich. Mit dieser schwachen Base läßt sich ein gleichbleibender pH-Bereich der wässrigen Phase einstellen, bei dem alle schwachen Basen extrahiert werden können. Eine Phenolatbildung ist infolge des pH-Bereiches $\leq$10 nicht möglich. Gleichzeitig wird bei der alkalischen Extraktion des Blutes eine andersartige Denaturierung der Proteine erreicht als bei der Extraktion im sauren Milieu. Dadurch sind die im Aceton-Rohextrakt auftretenden störenden Begleitstoffe in kleineren Mengen vorhanden und leichter zu entfernen.

Um Ausbeuteverluste durch Verdampfen flüchtiger Basen zu vermeiden, hat es sich als vorteilhaft erwiesen, dem Aceton-Rohextrakt vor dem Abdampfen auf dem Wasserbad eine verdünnte Säure zuzusetzen. Durch die Zugabe eines Protonendonators liegen die Basen als dissoziierte Verbindungen vor, mit niedrigeren Dampfdrucken bezw. höheren Sublimationstemperaturen als die nichtionisierten Basen. Bei der Temperatur des Wasserbades sind deswegen keine Arzneistoffverluste zu erwarten.

Für die Blutextraktion wird also folgende Arbeitsvorschrift vorgeschlagen:
4 ml Vollblut werden mit 6 g Kieselgur in einem Porzellanmörser gut verrieben und der Verreibung 2 ml einer 7 %igen Sodalösung zugegeben. Diese Mischung wird in einen Erlenmeyerkolben überführt, in dem sich bereits 100 ml Aceton befinden. Die Suspension wird zunächst mit einem Homogenisator eine Minute lang homogenisiert und dann etwa 30 Minuten mit einem Magnetrührer mechanisch gerührt. Nachdem sich die festen Bestandteile der Suspension abgesetzt haben, wird die überstehende Flüssigkeit durch ein Blauband-Filter hart Durchmesser 9 cm filtriert. Das Filtrat wird in einer Mensur aufgefangen und gemessen. Von diesem aliquoten Anteil der Gesamtflüssigkeitsmenge wird bei der Berechnung der Arzneistoffausbeute ausgegangen. Der Acetonextrakt wird dann auf dem Rand eines Wasser-

bades im Luftstrom bis zur Trockene eingedampft, nachdem vorher etwa 10 - 15 Tropfen 10 %ige Salzsäure zugegeben wurden.

Durch die Kombination der vorteilhaften Eigenschaften des Trägerstoffes Kieselgur und des Lösungsmittels Aceton werden gleich zu Beginn des Verfahrens viele Lipoide, Lipide und Proteine entfernt, die als unerwünschte Begleitstoffe die dünnschichtchromatographische Auftrennung und Identifizierung basischer Wirkstoffe stören.

2. Reinigung des Aceton-Rohextraktes

Der Verdampfungsrückstand des Aceton-Rohextraktes aus der Verreibung von Blut und Kieselgur erwies sich, nach eigenen Versuchen, für die Dünnschichtchromatographie noch nicht geeignet, wegen des hohen Anteils mitextrahierter Verunreinigungen. Infolge Überladung der Trägerschichten (Kieselgel G und Aluminiumoxid G) durch diese Stoffe, wurde eine ungenügende Auftrennung der basischen Substanzen mit störender Schwanzbildung und oft auch ein Zurückbleiben an den Startpunkten beobachtet. Diese mitentwickelten Verunreinigungen, die sich über die ganze Laufstrecke verteilten, vermögen infolge ihrer teilweisen Anfärbung mit dem Dragendorff-Reagens auch basische Arzneistoffe vorzutäuschen, da sie ähnliche Rf-Werte zeigen. Andererseits entzogen sich die basischen Wirkstoffe oft dem Nachweis, weil sie von großflächigen Verunreinigungen überlagert waren. Im Hinblick auf diese Unsicherheit bei der Identifizierung basischer Arzneistoffe ergab sich die Notwendigkeit einer Nachreinigung des Aceton-Auszuges.

Nach der alkalischen Extraktion mit Aceton hat es sich als vorteilhaft erwiesen, die Abtrennung störender Verunreinigungen aus dem Acetonextrakt im schwach sauren Milieu vorzunehmen. In diesem pH-Bereich liegt der isoelektrische Punkt vieler Aminosäuren, die als störende Begleitstoffe den dünnschichtchromatographischen Nachweis basischer Arzneistoffe stören. Der pH-Wert wurde mit einer Pufferlösung eingestellt,

um eine Strukturveränderung oder hydrolytische Spaltung der Wirkstoffe durch das Einwirken zu stark saurer Lösungen zu vermeiden. Es wurde eine auf pH 4 eingestellte Phosphatpufferlösung verwendet, der Methanol zugesetzt wurde, um eine leichte und vollständige Auflösung des Acetonrückstandes zu erreichen. Der Zusatz von Methanol zu der wässrigen Pufferlösung bewirkt außerdem eine Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und Peptiden.

Die in der Suspension feinverteilten Schwebeteilchen und ausgefällten Begleitstoffe werden durch Schütteln mit Kieselgur selektiv an den Trägerstoff adsorbiert, da infolge der hohen Polarität der alkoholhaltigen Pufferlösung die basischen Arzneistoffe vollständig von dem Sorptionsmittel desorbiert werden.

Nach der Filtration muß das Methanol aus der wässrigen Phase entfernt werden, da sonst bei der nachfolgenden Extraktion der basischen Wirkstoffe mit organischen Lösungsmitteln die organische Phase durch Aufnahme von Methanol zu stark polar wird. Die Zunahme der Polarität eines organischen Lösungsmittels oder Lösungsmittelgemisches bedeutet erfahrungsgemäß die verstärkte Mitextraktion unerwünschter Begleitstoffe aus der wässrigen Phase biologischer Extrakte. Außerdem erhöht der Methanolgehalt der wässrigen Phase das Lösungsvermögen für die basischen Wirkstoffe, wodurch ihr Verteilungskoeffizient ungünstig verändert wird. Die Abtrennung des Methanols erfolgt am einfachsten durch das Abdampfen auf dem Wasserbad im Luftstrom, da die Methode des Ausfrierens oder der Ausfällung mit Dinitrobenzoylchlorid wegen der zu befürchtenden Ausbeuteverluste an Arzneistoffen nicht geeignet erscheint.
Bei der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der aus der eingeengten methanolfreien wässrigen Phase ausgeschüttelten Basen mit den Laufmitteln Cyclohexan-Diäthyamin (9:1) auf Kieselgel G (52) und Choroform-Aceton-Ameisensäure (8:2:0,5) auf Aluminiumoxid G (61,62) war eine erhebliche Verminderung der von den Fließmitteln mitentwickelten Verunreinigungen nachweisbar. Bei der Detektion mit dem modifizierten

Dragendorff-Reagens waren die in geringer Menge vorhandenen unerwünschten Begleitstoffe hauptsächlich nur noch an den Startpunkten und an der Fließmittelfront sichtbar. Die halbquantitative Auswertung der Dünnschichtchromatogramme und die quantitative Bestimmung der Wirkstoffkonzentration nach dem indirekten Verfahren von VIDIC (58) ergaben keine Ausbeuteverluste durch die Nachreinigung des Aceton-Rohextraktes im schwach sauren pH-Bereich.

3. Versuche zur Ausschüttelung der basischen Arzneistoffe mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln im alkalischen Bereich

Nach dem Abtrennen störender Begleitstoffe aus der Blutprobe, wie in den Abschnitten B 1 und B 2 beschrieben, mußten nun für die Ausschüttelung der basischen Substanzen aus der wässrigen Phase die geeigneten organischen Lösungsmittel und der günstigste pH-Bereich ermittelt werden.

Nur die nichtdissoziierten, freien Basen lassen sich aus wässrigen Lösungen mit organischen Lösungsmitteln mit einem günstigen Verteilungskoeffizienten ausschütteln. Für die Extraktion wurde der schwach alkalische Bereich pH 9 gewählt, um bei den Wirkstoffen mit amphoteren Eigenschaften, die sich am besten am isoelektrischen Punkt ausschütteln lassen, eine Phenolat- oder Salzbildung durch Überschuß an Protonenakzeptoren zu vermeiden. Erfahrungsgemäß lassen sich auch die Phenothiazinderivate bei pH 9 - 10 besonders gut extrahieren.

Um eine Veränderung der basischen Arzneistoffe durch zu starke alkalische Lösungen zu verhindern, nach FELS et al. (58) werden Phenothiazine bereits in 1 normaler Alkalilösung zersetzt, wurde die pH-Konstanz mit Hilfe einer Pufferlösung gewährleistet. Es kamen nur anorganische Pufferlösungen in Frage, da aus organische Substanzen enthaltenden Pufferlösungen diese Stoffe in die organischen Lösungsmittel übergehen und dann bei der Dünnschichtchromatographie störend wirken können. Die anorganische Pufferlösung sollte verschiedene

Voraussetzungen erfüllen:

1. Die Pufferkapazität muß genügend groß sein
2. Sie soll eine ausfällende Wirkung auf unerwünschte Begleitstoffe in der wässrigen Phase haben
3. Es soll keine Strukturveränderung der basischen Wirkstoffe eintreten
4. Die Dichte von Pufferlösung und Lösungsmittel muß verschieden sein, um eine gute Trennung zwischen der organischen und wässrigen Phase zu erreichen

Bei Versuchen mit verschiedenen anorganischen Pufferlösungen erwies sich eine 1 molare Trikaliumphosphatlösung am geeignetsten.

Für die Wahl organischer Lösungsmittel zur Extraktion der Wirkstoffe war die Berücksichtigung ihrer Polarität für die Arzneistoffausbeute und Mitextraktion von Verunreinigungen von Bedeutung. Bei der Ausschüttelung mit Chloroform kam es wegen des lipophilen Charakters dieses Lösungsmittels zur Mitextraktion der noch in der wässrigen Phase verbliebenen Lipoide und Lipide und damit zur Bildung störender Emulsionen. Wegen der teilweise sehr ungünstigen Verteilungskoeffizienten war bei Überprüfung der Arzneistoffmenge im Verdampfungsrückstand der organischen Phase nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung die Ausbeuterate jedoch nicht befriedigend.

Bei Zugabe eines Lösungsmittels mit höherer Polarität zum Chloroform war eine Verbesserung der Arzneistoffausbeute zu erwarten; zunächst wurde Isopropanol im Verhältnis 80:20 zugegeben. Dieses Lösungsmittelgemisch war jedoch wegen der relativ starken Mitextraktion von Verunreinigungen aus der wässrigen Phase nicht vorteilhaft, obwohl bei Auswertung der Dünnschichtchromatogramme die Ausbeuterate wesentlich verbessert war. Wegen des ähnlichen chromatographischen Verhaltens der mitentwickelten Begleitstoffe war die halbquantitative Bestimmung der Arzneistoffkonzentration jedoch nur mit einer großen Fehlerbreite möglich.

Bei Versuchen mit verschiedenen anderen Lösungsmitteln, die

dem Chloroform in verschiedener Konzentration zugesetzt wurden, erwies sich Äthylacetat als sehr geeignet:

1. Bei der Extraktion mit Chloroform-Äthylacetat (60:40) sind wegen der höheren Polarität dieses Lösungsmittelgemisches die Verteilungskoeffizienten der basischen Wirkstoffe zwischen der wässrigen und der organischen Phase wesentlich günstiger als bei der Verwendung von Chloroform allein.
2. Nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung des Verdampfungsrückstandes der Chloroform-Äthylacetat-Phase und Detektion mit Sprühreagenzien waren bei Modellversuchen mit medikamentenfreien Blutproben nur an den Startpunkten und an der Fließmittelfront geringe Verunreinigungen nachweisbar.

Für die Nachreinigung der organischen Phase wurde Aktivkohle verwendet, da diese erfahrungsgemäß eine gute Reinigungswirkung für biologische Extrakte hat, infolge Adsorption organischer Farbstoffe und anderer hochmolekularer Verbindungen. Bei den Versuchen kam es jedoch nicht zur Adsorption basischer Wirkstoffe an die Kohle, so daß die gewählte Menge von 0,05 g Aktivkohle zum Chloroform-Äthylacetatauszug als unbedenklich angesehen werden kann.

Als Trocknungsmittel für die organische Phase wurde zunächst Natriumsulfat verwendet. Es ergaben sich jedoch Ausbeuteverluste bei der Ausschüttelung, da durch die Wasseraufnahme des getrockneten Salzes offenbar aus dem Lösungsmittelgemisch basische Wirkstoffe mit in das Kristallwasser eingeschlossen werden. Für das Verfahren hat sich deshalb zur Trocknung der organischen Phase eine mehrmalige Filtration durch trockene glatte Filter als zweckmäßig und völlig ausreichend erwiesen.

Zur Erzielung einer guten Ausbeute an basischen Arzneistoffen wurde die alkalische Lösung dreimal, jeweils 3 Minuten lang, mit dem organischen Lösungsmittelgemisch ausgeschüttelt.

4. Auswahl geeigneter Fließmittelsysteme zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der untersuchten basischen Wirkstoffe und ihre Detektion auf den Dünnschichtchromatogrammen

Die zahlreichen in der Literatur angegebenen Verfahren zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung basischer Substanzen werden vorwiegend nach der von STAHL (1) angegebenen Standardmethode durchgeführt.
Zur Herstellung der anorganischen Trägerschicht wird eine Verreibung von 1 Teil Kieselgel G oder Aluminiumoxid G mit 2 Teilen Wasser mit dem Streichgerät der Firma Desaga in einer Schichtdicke von 0,25 mm auf geeignete (20 x 20 cm) und vorher entfettete Glasplatten aufgetragen. Die beschichteten Platten werden zunächst bei Zimmertemperatur bis zum Abbinden getrocknet und anschließend zur Aktivierung eine Stunde in den Trockenschrank bei 110 Grad C gegeben. Die Aufbewahrung der aktivierten Platten erfolgt in einem Exsikkator über Calciumchlorid.
Der aufgelöste Verdampfungsrückstand der organischen Phase und die Leitsubstanzen werden mit einer Mikropipette auf die Startpunkte der nach Vorschrift bereiteten Dünnschichtplatten aufgetragen. Die Startpunkte waren auf einer 2 cm vom unteren Plattenrand entfernten Linie in einem Abstand von 2 cm angeordnet. Um eine möglichst gerade Fließmittelfront zu erhalten, wurde, wie auch von RAUDONAT (60) angegeben, an den seitlichen Plattenkanten etwa 2,5 cm der Trägerschicht streifenförmig entfernt und nach STAHL (1) bei Kammersättigung chromatographiert.
Die Leitsubstanzen wurden in Form 0,1 %iger methanolischer Lösungen stufenweise in Mengen von 5 - 20 µg und der mit etwas Äthanol-Aceton (1:1) aufgenommene Verdampfungsrückstand auf den Startpunkten in einer Fleckgröße von maximal 0,5 cm Durchmesser aufgetragen. Die Lösungsmittel wurden beim Auftragen in einem Heißluftstrom (Föhn) verdampft.
Es wurde das Verfahren der aufsteigenden Dünnschichtchromatographie angewendet. Dabei erfolgt die Auftrennung der Arznei-

stoffe bei konstanter Temperatur im Klimaschrank (10 Grad C) in sog. Trennkammern, Glaströge von genormter Größe mit aufgeschliffenem Glasdeckel, die etwa 100 ml Fließmittel enthalten und zur Kammersättigung mit Filtrierpapier ausgekleidet sind. Als Trennstrecke, Startpunkt bis Fließmittelfront, ist eine Entfernung von 10 - 15 cm ausreichend.
Zur Detektion der basischen Substanzen wurden zwei Sprühreagenzien verwendet. Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte halbquantitativ. Es wurden Fleckgröße und Abstufung der Farbintensität der mitentwickelten Testsubstanzen mit den Arzneistoff-Flecken verglichen. Durch Übung und Erfahrung kann mit dieser visuellen Vergleichsmethode die Arzneistoffkonzentration bis auf $\pm$ 1 - 2 µg genau geschätzt werden.
In der forensischen Toxikologie ist zur Identifizierung einer Substanz oder eines Substanzgemisches unbekannter Art oder Zusammensetzung die Beobachtung des Verhaltens in einem dünnschichtchromatographischen System nicht ausreichend. Bei der Identifizierung können sich leicht Verwechslungen ergeben durch Arzneistoffe mit ähnlichem Rf-Wert bei gleicher Anfärbbarkeit mit den Sprühreagenzien. Verläßliche Aussagen lassen sich nur durch Kombination der Ergebnisse aus mehreren Systemen treffen, die möglichst unterschiedliche Rf-Werte ergeben.

In der Literatur wird von vielen Autoren für die dünnschichtchromatographische Auftrennung basischer Substanzen die Kombination von saurem Sorptionsmittel und basischem Fließmittel verwendet, während andere Autoren Systeme mit saurem Fließmittel und basischen Trägerschichten bevorzugen.
Das von WALDI, SCHNACKERZ und MUNTER (52) vorgeschlagene System Cyclohexan-Diäthylamin (9:1) auf Kieselgel G - Schichten erwies sich als besonders gut geeignet für einen systematischen Untersuchungsgang im Rahmen der Problemstellung. Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der basischen Wirkstoffe erfolgt in diesem System (I) in der Form ihrer freien Basen.

Als zweites System wurde das von VIDIC (61) und NOACK (62)

entwickelte Fließmittel Chloroform-Aceton-Ameisensäure (8:2:0,5) auf Aluminiumoxid-Schichten verwendet, das sich wegen der gleichmäßigen Verteilung der basischen Substanzen über die ganze Laufstrecke als zweckmäßig erwies. In diesem System (II) wandern die untersuchten Basen als Salze.

Tabelle 6

Auftrennung basischer Arzneistoffe
in zwei dünnschichtchromatographischen Systemen

Arzneistoff	System I Cyclohexan 9 Diäthylamin 1 Kieselgel G	System II Chloroform 8 Aceton 2 Ameisensäure 0,5 Aluminiumoxid G
Codein	8	27
Dicodid	4	39
Dilaudid	7	20
Dionin	10	29
Dromoran	18	46
Eukodal	35	24
Narcotin	27	54
Paracodin	24	35
Dolantin	50	56
Jetrium	58	60
Polamidon	71	59
Ticarda	57	62
Avil	0	12
Kolton	54	50
Sandosten	61	37
Soventol	48	35
Chinin	0	9
Pyramidon	35	45
Antipyrin	4	79
Taxilan	37	17
Melleril	55	61
Megaphen	60	54
Neurocil	55	59
Valium	33	79

Zusammengestellt nach NOACK (62)
Die Zahlen bedeuten hundertfache Rf-Werte

Für die bei den Modellversuchen auf den Dünnschichtplatten mitentwickelten Testgemische wurden Leitsubstanzen ausgewählt, die sich gleichmäßig über die ganze Lauffläche verteilen. Ihre angegebenen Rf-Werte sind Mittelwerte aus mehreren Untersuchungen.

Tabelle 7

Testgemische für die dünnschichtchromatographischen Systeme

Systeme	Leitsubstanzen	100-facher Rf-Wert
Cyclohexan 9 Diäthylamin 1 Kieselgel G	Polamidon	71
	Romilar	61
	Dolantin	50
	Eukodal	35
	Codein	8
Chloroform 8 Aceton 2 Ameisensäure 0,5 Aluminiumoxid G	Revonal	95
	Reserpin	73
	Polamidon	59
	Strychnin	49
	Dicodid	39
	Eukodal	24
	Morphin	11
Benzol 12 Chloroform 6 Diäthylamin 2 Kieselgel G	Polamidon	90
	Pyramidon	78
	Dromoran	60
	Codein	45
	Morphin	10

Die Rf-Werte der in den gewählten dünnschichtchromatographischen Systemen untersuchten basischen Substanzen sind Relativwerte, die durch Vergleich mit den Rf-Werten der gleichzeitig mitentwickelten Leit- bezw. Bezugssubstanzen korrigiert wurden. Für diese Korrekturen wurden jeweils die Rf-Werte der dem Arzneimittelfleck nächstliegenden Substanz des Testgemisches verwendet.

Für die dünnschichtchromatographische Auftrennung von Phenothiazinderivaten und Substanzen mit ähnlicher chemischer Struktur wurde bei den Modellversuchen das von VIDIC (63) vorgeschlagene Fließmittel Benzol-Chloroform-Diäthylamin (12:6:2) auf Kieselgel G angewendet (System III). Für den forensisch-toxikologischen Nachweis dieser Psychopharmaca war ein gesondertes dünnschichtchromatographisches Verfahren vorteilhaft. Infolge der hohen Photosensibilität und Oxydierbarkeit dieser Substanzen treten neben den unzersetzten Verbindungen über die ganze Laufstrecke verteilte Abbauprodukte auf, die sich mit charakteristischer Färbung durch oxydierende Sprühreagenzien nachweisen lassen.

T a b e l l e 8

Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Detektion der Phenothiazinderivate und ihrer Abbauprodukte

Sorptionsmittel : Kieselgel G
Fließmittel : Benzol-Chloroform-Diäthylamin (12:6:2)

Arzneistoff	100-facher Rf-Wert	äthanol. H_2SO_4 (10%)
Megaphen	77	rotviolett
Abbauprodukt	58	rosa
Melleril	77	blaugrün
Abbauprodukt	58	blau
Abbauprodukt	44	rosa
Neurocil	82	blauviolett
Abbauprodukt	67	blau
Taxilan	67	rot
Abbauprodukt	26	rötlich
Tofranil	81	grünblau
Abbauprodukt	70	rötlich

Die Detektion der aufgetrennten basischen Wirkstoffe auf den entwickelten Dünnschichtchromatogrammen kann mit Sprühreagenzien und durch Nachweis von Fluoreszenzen bei Betrachtung

in UV-Licht erfolgen.

Für biologische Extrakte ist die Anwendung von UV-Licht zur Identifizierung basischer Substanzen jedoch wenig geeignet. Durch mitentwickelte Verunreinigungen kann es leicht zu Verwechslungen kommen, da diese unerwünschten Begleitstoffe Fluoreszenzlöschungen herbeiführen oder Fluoreszenzen vortäuschen können.
Zur sicheren Identifizierung basischer Substanzen in der Dünnschichtchromatographie werden deswegen neben den Rf-Werten in verschiedenen Systemen die Farbreaktionen mit mehreren Sprühreagenzien herangezogen. In der Literatur sind viele anorganische und organische Sprühreagenzien angegeben, von denen jedoch nur wenige zum Nachweis der basischen Wirkstoffe unter toxikologischen Bedingungen geeignet sind.
Ein für forensisch-toxikologische Zwecke geeignetes Sprühreagens muß mit kleinsten Substanzen empfindlich reagieren und darf keine sichtbare Reaktion mit den mitentwickelten Verunreinigungen aus biologischen Extrakten zeigen. Diese Voraussetzungen erfüllten am besten das Dragendorff-Reagens in der Modifikation nach JATZKEWITZ und die äthanolische Schwefelsäure (10 %) für Phenothiazinderivate.
Als Dragendorff-Reagens wird ein Jod-Kalium-Wismut-Komplex bezeichnet, von dem in der Literatur viele Modifikationen beschrieben werden. Dieses Reagens wird von vielen Autoren zum Nachweis basischer Substanzen verwendet.
Das Dragendorff-Reagens in der Modifikation von JATZKEWITZ eignet sich besonders gut als Universalreagens, da alle untersuchten basischen Substanzen als gelbe bis orangerote Flecken angezeigt werden. Infolge der geringen Konzentration des Jod-Kalium-Wismutkomplexes wird eine Färbung des Untergrundes weitgehend vermieden und dadurch sind die Substanzflecken leichter erkennbar und besser abgrenzbar. Durch die hohe Nachweisempfindlichkeit dieses Reagenses können noch Substanzmengen von 1 - 2 µg nachgewiesen werden. Das modifizierte Dragendorff-Reagens wird wie folgt hergestellt:
Lösung 1:0,85 g Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst.
Lösung 2:8,0 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst. Das

Gemisch beider Lösungen ergibt die Stammlösung. Vor dem Sprühen wird, wie von JATZKEWITZ angegeben, 1 ml dieser Stammlösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser verdünnt.
Bei der Dünnschichtchromatographie können wegen der anorganischen Sorptionsschichten aggressive Sprühreagenzien zur Detektion angewendet werden. Diese Reagenzien werden in der Literatur von vielen Autoren bevorzugt zum spezifischen Nachweis von Phenothiazinen eingesetzt, da bei Anwesenheit dieser Wirkstoffe charakteristisch gefärbte Oxydationsprodukte nachweisbar sind.
Zum Nachweis von Substanzen mit Phenothiazinstruktur wird u.a. von AWE und SCHULZE (55) Formalin-Schwefelsäure (2 %) verwendet; von PAULUS, HOCH und KEYMER (53) wird äthanolische Schwefelsäure (10 %), äthanolische Salpetersäure (10 %), eine Kaliumpermanganat- und eine Wasserstoffperoxdlösung vorgeschlagen.
Die Farbreaktionen der Phenothiazinderivate und ihrer Abbauprodukte nach Besprühen mit äthanolischer Schwefelsäure sind in der Tabelle 8 angegeben.
Die Verwendung äthanolischer Schwefelsäurelösung als Sprühreagens ergab noch einen weiteren Vorteil. Bei der Verwendung des Fließmittels Cyclohexan-Diäthylamin (9:1) trat manchmal wegen der unvollständigen Verdampfung der Base aus der Trägerschicht Kieselgel G ein Nachlassen der Empfindlichkeit des Dragendorff-Reagenses ein. Durch das vorsichtige Besprühen mit Schwefelsäure vor der Detektion kann jedoch der störende Basenüberschuß neutralisiert werden.
Die Beschränkung auf nur zwei Sprühreagenzien zum Nachweis der basischen Wirkstoffe entsprach der Absicht, im Rahmen der Problemstellung nur einfache und sichere Methoden zur Detektion heranzuziehen.

5. Arbeitsvorschrift für das neue Verfahren zum Nachweis basischer Arzneistoffe in kleinen Blutproben

Prinzip:

Das Vollblut wird nach dem Verreiben mit Kieselgur im schwach alkalischen pH-Bereich mit Aceton extrahiert und dadurch von der Hauptmenge störender Ballaststoffe befreit. Die Nachreinigung des Acetonextraktes wird durch Schütteln mit Kieselgur und anschließender Filtration im gepufferten schwach sauren Milieu erreicht. Durch Extraktion der gereinigten Lösung mit einer Mischung von Chloroform und Äthylacetat im gepufferten schwach alkalischen Milieu gehen die basischen Arzneistoffe in die organische Phase über. Die sauren Substanzen und unerwünschte Begleitstoffe verbleiben in der wässrigen Phase, die verworfen wird. Die organische Phase wird mit Aktivkohle nachgereinigt, und dann der Verdampfungsrückstand mit drei verschiedenen dünnschichtchromatographischen Systemen aufgetrennt. Die Detektion erfolgt mit zwei Sprühreagenzien.

Zusammenstellung der benötigten Chemikalien und Geräte

Aceton, DAB 6, einmal über Natriumhydroxid destilliert
Aktivkohle "Merck"
Aluminiumoxid "Merck", zur Dünnschichtchromatographie
Ameisensäure, wasserfrei, für die Chromatographie
Äthylacetat, DAB 6, drei Mal sauer (Salzsäure) und drei Mal alkalisch (Natriumhydroxid) gewaschen, mit Natriumsulfat sicc. getrocknet und destilliert
Chloroform-Äthylacetat, Lösungsmittelgemisch 60:40 Vol.T.
Cyclohexan "Merck", zur Chromatographie
Desaga, Standardausrüstung für die Dünnschichtchromatographie
Diäthylamin "Merck", für die Chromatographie
Dragendorff-Reagens in der Modifikation nach Jatzkewitz:
1 ml Stammlösung werden mit 2 ml Eisessig und

10 ml Wasser gemischt
Stammlösung: Lösung I - 0,85 g Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst
Lösung II - 8,0 g Kaliumjodid werden in 20 ml Wasser gelöst

Homogenisator (hochtourig)

Kieselgel G "Merck", zur Dünnschichtchromatographie

Kieselgur "Merck", säuregewaschen und geglüht, nachbehandelt durch Extraktion mit Aceton

Magnetrührer

Natriumcarbonat, 7 %ige Lösung von Natriumcarbonat in destilliertem Wasser

Phosphatpuffer pH 4, 4 %ige KH_2PO_4-Lösung gegen Indikator mit 25 %iger Phosphorsäure auf pH 4 eingestellt, danach mit Methanol im Verhältnis 1:1 verdünnt

alkoholische Salzsäure, 1 Vol.T. Äthanol 90 %ig, 1 Vol.T. konzentrierte Salzsäure

10 %ige Salzsäure

äthanolische Schwefelsäure, 90 Vol.T. Äthanol 90 %ig und 10 Vol.T. konzentrierte Schwefelsäure

Trikaliumphosphat, 1 molare Lösung von Trikaliumphosphat in destilliertem Wasser

Arbeitsanleitung

1. Vollblutextraktion mit Aceton
2. Reinigung des Aceton-Rohextraktes im sauren Bereich
3. Extraktion der basischen Arzneistoffe im alkalischen Bereich
4. Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Nachweis der basischen Wirkstoffe

1. Vollblutextraktion mit Aceton

4 ml Vollblut werden mit 6 g Kieselgur in einem Porzellanmörser gut verrieben, der Mischung 2 ml einer 7 %igen Natriumcarbonatlösung zugesetzt und nochmals verrieben.

Diese Mischung wird in einen Erlenmeyerkolben gegeben, in dem sich bereits 100 ml Aceton befinden, und anschließend etwa 1 Minute lang homogenisiert.
Das Homogenisat wird dann 30 Minuten lang mechanisch gerührt (Magnetrührer).
Nachdem sich die festen Bestandteile der Suspension abgesetzt haben, wird die überstehende Flüssigkeit durch ein Blauband-Faltenfilter hart Durchmesser 9 cm filtriert.

2. Reinigung des Aceton-Rohextraktes im sauren Bereich

Der Acetonauszug wird in einem Abdampfschälchen auf dem Rand eines Wasserbades im schwachen Luftstrom bis zur Trockene eingedampft, nachdem vorher 10 - 15 Tropfen 10 %ige Salzsäure zugegeben wurden.
Der Rückstand wird mit 30 ml einer methanolisch-wässrigen Phosphatpufferlösung pH 4 aufgenommen, indem das Schälchen jeweils mit kleinen Portionen dieser Lösung gespült wird; der Rückstand wird dabei durch Reiben mit einem Glasstab von den Wänden abgelöst.
Die Suspension wird in eine 50 ml Mensur mit eingeschliffenem Glasstopfen überführt und dann mit 0,5 g Kieselgur versetzt. Nach dem Schütteln, 3 Minuten lang, wird dann die Mischung durch ein Blauband-Faltenfilter hart Durchmesser 7 cm filtriert.
In einem Abdampfschälchen wird das Filtrat auf dem Wasserbad soweit eingeengt, bis das in der Pufferlösung enthaltene Methanol praktisch verdampft ist.

3. Extraktion der basischen Arzneistoffe im alkalischen Bereich

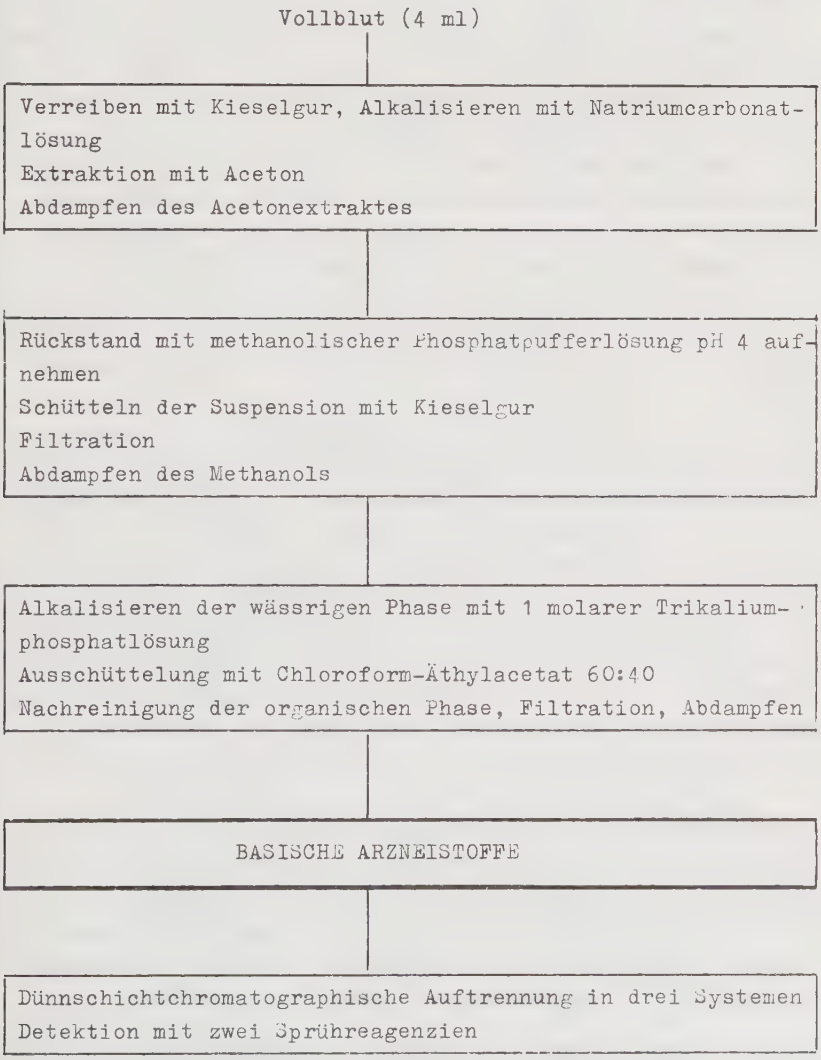
Der wässrigen Lösung werden nach Abkühlen auf Zimmertemperatur etwa 3 - 5 ml einer 1 molaren Trikaliumphosphatlösung bis zur alkalischen Reaktion pH 9 (mit Indikatorpapier prüfen) zugesetzt.
In einem Scheidetrichter wird dann die alkalische Flüssigkeit 3 Mal mit je 30 ml Chloroform-Äthylacetat (60:40), jeweils 5 Minuten lang, geschüttelt.
Die organischen Phasen (Chloroform-Äthylacetatauszug) werden

jeweils durch ein glattes Blauband-Filter hart Durchmesser 7 cm filtriert, in einem Erlenmeyerkolben vereinigt und mit 0,05 g Aktivkohle geschüttelt.
Nach 20 Minuten wird wiederum durch ein glattes Blauband-Filter hart Durchmesser 7 cm filtriert. Die abgetrennte wässrige Phase wird verworfen.
Das Filtrat wird dann in einem Abdampfschälchen auf dem Rand eines Wasserbades bis zur Trockene eingedampft, nachdem vorher etwa 10 Tropfen alkoholische Salzsäure zugegeben wurden.

4. Dünnschichtchromatographische Auftrennung und Nachweis der basischen Wirkstoffe

Der Verdampfungsrückstand des organischen Lösungsmittelextraktes wird in wenig Äthanol-Aceton 1:1 aufgenommen und in drei gleiche Teile geteilt.
a) Der erste Teil des Rückstandes wird auf einer Kieselgel-Dünnschichtplatte mit dem Fließmittel Cyclohexan-Diäthylamin (9:1) entwickelt (System I). Die Detektion erfolgt mit dem Dragendorff-Reagens in der Modifikation nach Jatzkewitz.
b) Wenn der Substanzfleck nicht einem bestimmten basischen Arzneistoff zugeordnet werden kann, dann wird der zweite Teil des Rückstandes auf einer Aluminiumoxid-Dünnschichtplatte mit dem Fließmittel Chloroform-Aceton-Ameisensäure (8:2:0,5) entwickelt (System II). Die Detektion erfolgt mit dem modifizierten Dragendorff-Reagens.
c) Zum Nachweis von Phenothiazinen wird die Entwicklung mit dem Fließmittel Benzol-Chloroform-Diäthylamin (12:6:2) auf einer mit Kieselgel beschichteten Dünnschichtplatte vorgeschlagen (System III). Dazu wird der dritte Teil des Rückstandes verwendet. Die Detektion erfolgt mit äthanolischer Schwefelsäure (10 %).
Wegen der nicht genau reproduzierbaren Rf-Werte sind auf jeder Dünnschichtplatte neben dem nachzuweisenden Arzneistoff entsprechende Leit- oder Testsubstanzen in verschiedener Konzentration mitzuentwickeln.

Schema des neuen Verfahrens
zum Nachweis
basischer Arzneistoffe in kleinen Blutproben



6. Auswertung der Modellversuche

Der Wert des neuen chemisch-toxikologischen Verfahrens zum Nachweis basischer Arzneistoffe in kleinen Blutproben kann am besten aus den Ausbeuteraten der Modellversuche (Tabelle 9) abgelesen werden, die als Mittelwerte aus mehreren Versuchsreihen aufgestellt wurden. Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte halbquantitativ, so daß mit einer Streuung der nachgewiesenen Arzneistoffkonzentration um ± 10 % gerechnet werden muß. Für die Modellversuche wurden arzneistoffreie Blutproben (4 ml) verwendet, denen jeweils basische Wirkstoffe in einer Menge von 25 µg (entsprechend einer Konzentration von 0,6 mg %) zugesetzt wurden.

Die Versuchsergebnisse sind bei den Wirkstoffen mit Phenothiazinstruktur etwas ungünstiger. Es lassen sich jedoch bei der Ausarbeitung eines allgemeinen Verfahrens die verschiedenen chemischen und physikalischen Eigenschaften der basischen Arzneistoffe nicht gleichwertig berücksichtigen. Bei Zusatz von länger aufbewahrten wässrig-alkoholischen Lösungen der Phenothiazinderivate lagen die Ausbeuteraten zwischen 40 und 50 %, da diese Lösungen zum Teil oxydierte Verbindungen enthielten. Auf den Dünnschichtchromatogrammen waren unter diesen Versuchsbedingungen nur noch Spuren der unveränderten Wirkstoffe nachweisbar, während sich die Abbauprodukte über die ganze Laufstrecke verteilten. Es ließen sich dagegen Ausbeuteergebnisse von 50 ±10 % nachweisen, wenn für die Modellversuche frischbereitete Lösungen verwendet wurden.

Bei der Ausarbeitung des vorliegenden Untersuchungsganges wurde bei den Reinigungsmaßnehmen der hohe Anteil an Ballaststoffen bei alten und fauligen Blutproben berücksichtigt. Bei Versuchen mit weitgehend zersetztem Blut konnten, je nach Struktur der basischen Wirkstoffe, 40 - 90 % der zugesetzten Arzneistoffe wiedergewonnen und identifiziert werden.

Es sind vorwiegend nur diejenigen basischen Substanzen untersucht worden, die sich in den letzten Jahren als toxikologisch

bedeutsam erwiesen haben. Zum Nachweis basischer Wirkstoffe in Blutproben, die nicht in der Zusammenstellung der untersuchten Arzneistoffe enthalten sind, müssen zunächst einige Modellversuche durchgeführt werden.

Bei der Erstellung von Gutachten in der forensischen Toxikologie, bei Verkehrsstrafsachen und gerichtsmedizinischen Untersuchungen, können durch Auswertung der Versuchsergebnisse folgende wichtige Aussagen gemacht werden:

1. Die in der Blutprobe nachgewiesene Arzneistoffmenge läßt auf die Einnahme einer therapeutischen oder toxischen Dosis schließen.
2. Die untersuchte Blutprobe enthält mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit keine unter der Nachweisbarkeitsgrenze dieses Verfahrens liegenden und mit den angewandten Detektionsreagenzien erfaßbaren Konzentrationen basischer Wirkstoffe.

Tabelle 9

Arzneistoffausbeute nach Anwendung des neuen chemisch-toxikologischen Verfahrens (Modellversuche)

I. Analgetica der Morphinreihe
II. synthetische Analgetica
III. Antihistaminica
IV. Antipyretica
V. Psychopharmaca

	Handelsname	Arzneistoffausbeute
I.	Codein	75 ± 10 %
	Dicodid	75 ± 10 %
	Dilaudid	65 ± 10 %
	Dromoran	65 ± 10 %
	Eukodal	80 ± 10 %
	Narcotin	65 ± 10 %
	Paracodin	70 ± 10 %

	Handelsname	Arzneistoffausbeute
II.	Dolantin	80 ± 10 %
	Jetrium	80 ± 10 %
	Polamidon	80 ± 10 %
	Ticarda	70 ± 10 %
III.	Avil	70 ± 10 %
	Kolton	70 ± 10 %
	Sandosten	75 ± 10 %
	Soventol	75 ± 10 %
IV.	Chinin	75 ± 10 %
	Pyramidon	65 ± 15 %
	Antipyrin	65 ± 15 %
V.	Taxilan	50 ± 10 %
	Melleril	55 ± 10 %
	Megaphen	50 ± 10 %
	Neurocil	50 ± 10 %
	Tofranil	70 ± 10 %
	Valium	75 ± 10 %

Die angegebene Streuung entspricht der maximalen Fehlerbreite bei der halbquantitativen Auswertung der Substanzflecken auf den Dünnschichtchromatogrammen.

C. DIE ANWENDUNG DES VERFAHRENS BEI ZWEI GERICHTSMEDIZINISCH-TOXIKOLOGISCHEN UNTERSUCHUNGEN

Zur Erstellung von Gutachten in der forensischen Toxikologie ist das nach eigenen Versuchen entwickelte Verfahren schon mehrmals erfolgreich eingesetzt worden.

An zwei Beispielen soll die Anwendbarkeit des in der vorliegenden Arbeit beschriebenen neuen Untersuchungsganges zum Nachweis basischer Arzneistoffe in kleinen Blutproben aufgezeigt werden.

1. Beispiel: Bei der gerichtlichen Sektion des ertrunkenen 32-jährigen H.H. Sch. waren im Mageninhalt Tablettenreste nachweisbar. Aus der Vorgeschichte ging hervor, daß der tödlich Verunglückte, der als guter Schwimmer bekannt war, wegen depressiver Stimmungen in ärztlicher Behandlung gewesen war und öfter Selbsttötungsabsichten geäußert hatte.
Bei der chemisch-toxikologischen Untersuchung einer Blutprobe der Leiche, nach der in Abschnitt B 5 angegebenen Vorschrift, waren basische Wirkstoffe nachweisbar.
Es wurden auf den Dünnschichtchromatogrammen mit den Systemen I, II und III, Trägerschichten und Zusammensetzung der Fließmittel wie in Abschnitt B 4 beschrieben, folgende Rf-Werte und Farbreaktionen festgestellt:

System	Rf-Wert der Arzneistoff-Flecken	Sprühreagenzien	
		Dragendorff-R.	äthanol. H_2SO_4
I	67	orangerot	-
	35	orangerot	-
II	45	orangerot	-
III	81	-	grünblau
	70	-	rötlich

Aus diesen Versuchsergebnissen ließ sich somit nachweisen, daß in der untersuchten Blutprobe die basischen Wirkstoffe Pyramidon und Tofranil enthalten waren.

Bei der nach halbquantitativer Auswertung der Dünnschichtchromatogramme festgestellten Pyramidon- und Tofranilkonzentration, Pyramidon 2,6 mg % und Tofranil 3,0 mg %, handelte es sich um ein Vielfaches jener Konzentration, die bei der Einnahme einer therapeutischen Dosis im Blut gefunden wird.

Die gleichen basischen Arzneistoffe wurden auch im Mageninhalt und in einer Urinprobe nach dem Verfahren von STAS-OTTO festgestellt. In den Leichenteilen wurde außerdem eine Überdosis des sauren Wirkstoffes Butobarbital nachgewiesen.
Obwohl es sich bei der untersuchten Blutprobe um fauliges und weitgehend zersetztes Blut handelte, waren nur geringe Verunreinigungen an den Startpunkten und an der Fließmittelfront der Dünnschichtchromatogramme sichtbar, die den Arzneistoffnachweis nicht störten.
Bei der Zusammenfassung der Analysenergebnisse konnte ausgesagt werden, daß der Ertrinkungstod des H.H. Sch. durch eine hochgradige Benommenheit ausgelöst wurde, die in unmittelbarer Beziehung zu der hypnotischen Wirkung der nachgewiesenen Arzneistoffe stand.

2. Beispiel: Bei der Leichenöffnung der 63-jährigen E. H. waren keine Organveränderungen nachweisbar, die einen plötzlichen Tod aus natürlicher Ursache erklärt haben könnten. Außerdem waren an der Leiche auch keine Zeichen fremder mechanischer Gewalteinwirkung feststellbar. Aus dem Sektionsprotokoll ging hervor, daß der Tod unter den morphologischen Zeichen einer Herz- und Kreislaufinsuffizienz eingetreten war. Nach den Angaben der Verwandten hatte E. H. mehrmals Selbsttötungsabsichten geäußert und Selbstmordversuche unternommen, außerdem war sie wegen Depressionen seit Jahren in ambulanter und zum Teil auch stationärer ärztlicher Behandlung gewesen.
Zur Klärung der Todesursache waren chemisch-toxikologische Untersuchungen von Asservaten der Leiche notwendig. Im Magen- und Dünndarminhalt, der nach dem STAS-OTTO-Verfahren untersucht wurde, waren nur erhebliche Mengen von Chlorpromazin (Megaphen) nachweisbar.

Nach der Arbeitsanleitung für den neuen Untersuchungsgang zum Nachweis basischer Wirkstoffe wurde eine Blutprobe der Leiche untersucht, und nach dem gleichen Verfahren auch die Chlorpromazinkonzentration im Gehirn und der Muskulatur (homogenisierte Asservate) bestimmt. Für die Untersuchungen der Asservate wurden jeweils die doppelten Mengen an Untersuchungsmaterial, Chemikalien und Reagenzien verwendet.
Es wurden auf den Dünnschichtchromatogrammen mit den Systemen I und III, Trägerschichten und Zusammensetzung der Fließmittel wie in Abschnitt B 4 beschrieben, folgende Rf-Werte und Farbreaktionen festgestellt:

System	Rf-Wert der Arzneistoff-Flecken	Sprühreagenzien	
		Dragendorff-R.	äthanol. H_2SO_4
I	60	orangerot	-
III	78	-	rotviolett
	58	-	rosa

Bei der halbquantitativen Auswertung der Dünnschichtchromatogramme wurde jeweils eine toxische Chlorpromazinkonzentration in den untersuchten Asservaten nachgewiesen, und zwar 0,75 mg % im Blut, 1,65 mg % im Gehirn und 2,25 mg % in der Muskulatur. Durch diese chemisch-toxikologischen Untersuchungen wurde der Verdacht auf Arzneimittelintoxikation bestätigt und es konnte abschließend ausgesagt werden, daß die ermittelte Chlorpromazindosis als wesentlich wirkende Ursache zum Tod beigetragen hatte.

Das neue mikro-analytische Verfahren ist auch schon bei Verkehrsstrafsachen mehrmals eingesetzt worden.

D. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird ein Untersuchungsgang zum Nachweis und der halbquantitativen Bestimmung basischer Wirkstoffe in kleinen Blutproben beschrieben. Dieses neue mikroanalytische Verfahren kann bei Verkehrs- und anderen Strafsachen sowie bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Bei der Ausarbeitung des Verfahrens wurde besonderer Wert auf die Entfernung störender Begleitstoffe aus der Blutprobe gelegt, da mitextrahierte Verunreinigungen erfahrungsgemäß den dünnschichtchromatographischen Nachweis von Arzneistoffen stören. Dieses Problem hat bei den bisher bekanntgewordenen chemisch-toxikologischen Untersuchungen, Extraktion von Arzneistoffen aus biologischem Material und Nachweis mit chromatographischen Verfahren, noch zu wenig Beachtung gefunden. Die beste Abtrennung von Ballaststoffen konnte durch Acetonextraktion der mit Kieselgur verriebenen, alkalisierten Blutprobe erreicht werden, sowie auch durch eine Nachreinigung des Acetonauszuges durch selektive Adsorption an Kieselgur beim Schütteln des in einem wässrig-methanolischen Puffer (pH 4) gelösten Extraktionsrückstandes.

Für die Extraktion der basischen Arzneistoffe erwies sich, im Rahmen der Problemstellung, ein schwach alkalischer Bereich (pH 9) und das Lösungsmittelgemisch Chloroform-Äthylacetat (60:40) als am besten geeignet.
Die Entfernung restlicher Verunreinigungen aus der organischen Phase wurde durch Aktivkohle erreicht.

Für den Nachweis der basischen Wirkstoffe wurde das Verfahren der aufsteigenden Dünnschichtchromatographie angewendet.

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung des Verdampfungsrückstandes der organischen Phase erfolgte in drei verschiedenen Systemen mit der Kombination von saurem Sorptionsmittel

und basischen Fließmittel sowie basischer Trägerschicht und saurem Fließmittel:

System I	Sorptionsmittel:	Kieselgel G "Merck"
	Fließmittel:	Cyclohexan-Diäthylamin (9:1)
System II	Sorptionsmittel:	Aluminiumoxid G "Merck"
	Fließmittel:	Chloroform-Aceton-Ameisensäure (8:2:0,5)
System III	Sorptionsmittel:	Kieselgel G "Merck"
	Fließmittel:	Benzol-Chloroform-Diäthylamin (12:6:2)

Die Identifizierung der basischen Wirkstoffe auf den Dünnschichtchromatogrammen erfolgte nach Detektion mit einem modifizierten Dragendorff-Reagens und mit äthanolischer Schwefelsäure (10 %), durch Feststellung der Rf-Werte der Arzneimittelflecken in den genannten Systemen.
Die Auswertung der Dünnschichtchromatogramme erfolgte halbquantitativ durch visuellen Vergleich mit Standardlösungen der entsprechenden Arzneistoffe in bestimmten Konzentrationen.

Die Arzneistoffausbeuten der Modellversuche haben gezeigt, daß je nach dem chemischen und physikalischen Verhalten der Wirkstoffe 40 - 90 % der den Blutproben zugesetzten basischen Arzneistoffe wiedergewonnen und identifiziert werden konnten.

Es wurden bei den Modellversuchen vorwiegend nur diejenigen basischen Substanzen untersucht, die sich in den letzten Jahren als toxikologisch bedeutsam erwiesen haben.

In Zusammenhang mit am Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin durchgeführten Sektionen und Blutalkoholbestimmungen wurde die Anwendbarkeit des vorliegenden Verfahrens für forensisch-toxikologische Untersuchungen bei verkehrs- und gerichtsmedizinischen Fragestellungen festgestellt.

Durch Auswertung der Ergebnisse des neuen Analysenverfahrens kann ausgesagt werden, ob die Blutprobe entweder keine oder unter der Nachweisbarkeitsgrenze liegende Menge von Arzneistoffen enthält, oder ob die festgestellte Arzneistoffkonzentration auf die Einnahme einer therapeutischen oder toxischen Dosis schließen läßt.

E. LITERATURVERZEICHNIS

1 STAHL, E.
Dünnschichtchromatographie
Springer Verlag
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962

2 RANDERATH, K.
Dünnschichtchromatographie
Verlag Chemie G.m.b.H.
Weinheim/Bergstraße, 1962

3 LEDERER, E. and LEDERER, M.
Chromatography
Elsevier Publishing Comp.
Amsterdam-Houston-London-New York, 1955

4 BAMANN, E. und ULLMANN, E.
Chem. Untersuchungen von Arzneigemischen, Arzneispezialitäten und Giftstoffen
2. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft M.B.H.
Stuttgart, 1960

5 GRAF, E. und PREUß, Fr.R.
Gadamers Lehrbuch der chemischen Toxikologie und Anleitung zur Ausmittelung der Gifte
5. Auflage, Band II, Allgemeine Methoden
Göttingen, Vandenhoeck & Ruprecht, 1966

6 BAUER, H. und MOLL, H.
Die organische Analyse unter besonderer Berücksichtigung der Arzneistoffe
Akademische Verlagsgesellschaft Geest & Portig K.G.
Leipzig, 1967

7 NEGWER, M.
Organisch-chemische Arzneimittel und ihre Synonyma
Akademie-Verlag-Berlin
Berlin, 1959

8 WAGNER, H.-J.
Arzneim.-Forsch. 11, 992, 1961

9 PRIBILLA, O.
Zbl. Verkehrs-Med. 11, 88, 1965

10 SCHÜLE, H.
Fortschr. Kiefer- und Gesichtschirurg. 5, 80, 1959

11 OSTERHAUS, E.
Arzneim.-Forsch. 12, 1079, 1962

12 OSTERHAUS, E.
Arzneim.-Forsch. 14, 923, 1964

13 SOEHRING, K.
Pharm. Ztg. 106, 637, 1961

14 VIDIC, E.
Mitt. dtsch. Ges. Verkehrsmed. e.V. 8, 51, 1960

15 BÖHMER, K.
Münch. Med. Wschr. 1144, 1959

16 KREUSCHER, H. und FREY, R.
Arzneim.-Forsch. 12, 1056, 1962

17 SCHMIDT, G.
Bayr. Ärzteblatt Hft. 7, 485, 1963

18 STAS, J.
Bull. acad. royale méd. Belgique Brussels
11, 304, 1851

19 OTTO, F.
J. Ann. 100, 39, 1856

20 FREIMUTH, H.C.
in: STEWART, C.P. and STOLMAN, A.
Toxicology, Mechanisms and Analytical Methods
Academic Press, New York-London
Volume I, 293, 1960

21 CURRY, A.S. and PHANG, S.E.
J. Pharm. and Pharmacol. 12, 437, 1960

22 STREET, H.V.
J. Forensic Sci. 7, 222, 1962

23 KOPPANY, T., DILLE, J.M., MURPHY, W.S. and KROPS, S.J.
J. Ann. Pharm. Assoc. 23, 1074, 1934

24 FOLIN, C., WU, H.
J. biol. Chem. 38, 81, 1919

25 CHERANY, P. and LOBO, R.
J. Pharm. 20, 400, 641, 1934

26 ALHA, A.R., LINDFORS, R.O.
Ann. Med. Exp. Biol. Fenn. 37, 149, 1959

27 PAULUS, W.
Arch. f. Toxikol. 20, 194, 1963

28 MACHATA, G.
Wien. klin. Wschr. 71, 301, 1959

29 STOLMAN, A. and STEWART, C.P.
Analyst 74, 543, 1949

30 STOKES, D.M., CAMP, W.J.R. and KIRCH, E.R.
J. Pharm. Sci. 52, 1106, 1963

31 VIDIC, E.
unveröff. Mitt.: Die quant. Bestimmung von Doriden (Glutethimid) in Blut und Geweben

32 LEVVY, G.A.
Biochem. J. 34, 73, 1940

33 RAVENTOS, J.
Brit. J. Pharmacol. 1, 210, 1946

34 SUNSHINE, I. and GERBER, S.R.
Spectrophotometric analysis of drugs including atlas of spectra
Charles C. Thomas publishers, 1963
Springfiels, Illinois, USA

35 BÄUMLER, J., RIPPSTEIN, S.
Pharm. Act. Helv. 36, 382, 1961

36 WALDI, D.
in: (5), S. 124

37 MULÉ, S.J.
Analyt. Chem. 36, 1907, 1964

38 COCHIN, J., DALY, J.W.
J. Pharm. exp. Ther. 139, 154, 1963

39 VIDIC, E. und SCHÜTTE, J.
Arch. Pharm. 295, 342, 1962

40 FELDSTEIN, M., KLENDSHOJ, N.C.
Analyst 78, 43, 1953

41 ULBERGER, C.J., STOLMAN, A. and SCHWARZ, H.
Proc. Ann. Acad. Forensic Sci. 1, 250, 1951

42 UHLMANN, H.J.
Pharm. Ztg. 25, 936, 1967

43 GENDI, S.E., KISSER, W. und MACHATA, G.
Mikrochim. Acta 120, 1965

44 HÄUSSLER, A.
Arzneim.-Forsch. 10, 585, 1960

45 JATZKEWITZ, H.
Z. physiol. Chem. 292, 94, 1953

46 VIDIC, E.
Arzneim.-Forsch. 7, 314, 1957

47 IZMAILOW, N.A., SHRAIBER, M.S.
Farmazia (russ.) 3, 1, 1938

48 MEINHARD, J.E. and HALL, N.F.
Analytic. Chem. 21, 185, 1949

49 KIRCHNER, I.G., MILLER, J.M. and KELLER, G.J.
Analytic. Chem. 23, 420, 1951

50 MACHATA, G.
Mikrochim. Acta 79, 1960

51 KELEMEN, J., PATAKI, G.
Z. f. analyt. Chem. 195, 81, 1963

52 WALDI, D., SCHACKERZ, K., MUNTER, F.
J. Chromatog. 6, 61, 1961

53 PAULUS, W., HOCH, W. und KEYMER, R.
Arzneim.-Forsch. 13, 609, 1963

54 EBERHARDT, H., LERBS, O.W. und FREUNDT, K.J.
Arzneim.-Forsch. 13, 804, 1963

55 AWE, W. und SCHULZE, W.
Pharm. Ztg. 107, 1333, 1962

56 AWE, W. und TRACHT, H.G.
Pharm. Ztg. 108, 1365, 1963

57 STRAIN, H.H.
Chromatographic Adsorption Analysis
Interscience Publ., Inc. New York, 1942

58 VIDIC, E.
Naunyn-Schmiedebergs-Arch. f. exp. Pathol.
u. Pharm. 212, 339, 1951

59 FELS, G.I., KAUFMANN, M., KARCZMAR, A.G.
Nature (London) 181, 1266, 1958

60 RAUDONAT, W.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 59, 175, 1967

61 VIDIC, E.
Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 57, 313, 1966

62 NOACK, P.
Inaugural Dissertation
Freie Universität Berlin 1964

63 VIDIC, E.
unveröff. Mitt.

64 BLAZEK, J., SPINKOVA, V., STEJSKAL, Z.
Pharmazie 9, 509, 1962

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Professor Dr. Ing. Ernst V i d i c im Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Professor Dr.-Ing. Ernst V i d i c möchte ich an dieser Stelle für die wohlwollende Förderung und großzügige Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit herzlich danken.

Herrn Professor Dr. med. Walter K r a u l a n d , dem Direktor des Instituts für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin, danke ich für die Freistellung eines Arbeitsplatzes.

LEBENSLAUF

Am 5. Februar 1942 wurde ich, Marianne Heymons, als Tochter des Chemikers Dr. phil. nat. Albrecht Heymons und seiner Ehefrau Ingeborg, geb. Eisermann, in Berlin geboren.

Von 1948 bis 1961 besuchte ich in Berlin die Grund- und Oberschule und erwarb Ende Februar 1961 an der Malwida-von-Meysenbugschule das Zeugnis der Reife.

Vom Sommersemester 1961 bis zum Sommersemester 1967 studierte ich an der Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin Humanmedizin und habe dort am 29. 9. 1967 das medizinische Staatsexamen bestanden.

Während des Studiums, 1965, begann ich unter Anleitung von Herrn Professor Dr.-Ing. Ernst Vidic im Institut für gerichtliche und soziale Medizin der Freien Universität Berlin mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation.

Seit November 1967 bin ich in Berlin als Medizinalassistentin tätig.